

日 本 国 特 許 庁

01.06.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年 6月 1日

REC'D 27 JUL 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第154364号

出 願 人  
Applicant(s):

北村 俊雄  
中外製薬株式会社

4

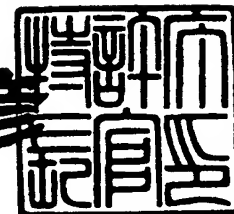
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3051966

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-105

【提出日】 平成11年 6月 1日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都港区白金 6-16-20-406

    【氏名】 北村 俊雄

【特許出願人】

    【識別番号】 599002744

    【氏名又は名称】 北村 俊雄

【特許出願人】

    【識別番号】 000003311

    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 パッケージング細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 レトロウイルスの産生に用いられる細胞であって、E F 1  $\alpha$  プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を有する細胞。

【請求項 2】 レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、g a g、p o l、e n vからなる群より選択される1または複数のタンパク質をコードするDNAである、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】 g a g、p o l、e n vのすべてを発現する、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】 g a gおよびp o lを発現する発現構築物とe n vを発現する発現構築物とを有する、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】 e n vがエコトロピックレトロウイルス由来のe n vまたはアンフォトロピックレトロウイルス由来のe n vである、請求項 3 または 4 に記載の細胞。

【請求項 6】 発現構築物中のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAの翻訳開始コドンの上流に、K o z a kのコンセンサス配列が配置されている、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 7】 レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAがI R E S配列を介して選択マーカーをコードするDNAと結合している、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 8】 レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、該タンパク質のコード領域以外のウイルスゲノム由来DNAを実質的に有さない、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 9】 細胞が2 9 3細胞由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 0】 細胞が2 9 3 T細胞由来である、請求項 9 に記載の細胞。

【請求項 1 1】 寄託番号F E R M B P - 6 7 3 7で特定される細胞。



【請求項 12】 請求項 1 から 11 に記載の細胞に、少なくとも 1 つの構造タンパク質をコードする遺伝子を欠損しているレトロウイルスベクター DNA を導入する工程を含む、レトロウイルスの産生方法。

【請求項 13】 レトロウイルスベクター DNA が、gag、pol、および env をコードする遺伝子をすべて欠損している、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 レトロウイルスベクター DNA に外来遺伝子が含まれている、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】 請求項 12 から 14 のいずれかに記載の方法により生産されたレトロウイルス。

# 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、高力価ウイルスを生産する能力を安定に保持するウイルス生産細胞（パッケージング細胞）およびウイルス生産のための該細胞の利用に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

レトロウイルスベクターは、宿主細胞に対し高い効率で、しかも安定に遺伝子を導入できることから、細胞への遺伝子導入法として医療分野を含む広い分野で用いられている。レトロウイルスベクターの作製は、レトロウイルスの遺伝子構造、生活環のメカニズムに基づき開発されてきた。その基本原理は、パッケージングシグナルは有するが、gag、pol、env の各構造遺伝子を欠如するレトロウイルスベクターに目的の遺伝子を導入し、当該レトロウイルスベクターを、パッケージングシグナルを欠くが、gag、pol、env の各構造遺伝子を有するパッケージング細胞に導入し、レトロウイルスベクター RNA を含むウイルス粒子を形成（パッケージング）させ、その培養上清にレトロウイルスを産生するものである（Kitamura T., International Journal of Hematology, 67, 351-359, 1998）。この様にして産生されたレトロウイルスは、目的とする遺伝子を効率よく細胞に導入することができる。一方、gag、pol、env の各構造遺伝子を欠如する為、パッケージング細胞の中でのみ複製でき、通常の細胞においては複製できない。従って

、作製した感染細胞から再度レトロウイルスが産生されることがない。

【 0 0 0 3 】

このような特徴を有するパッケージング細胞の作製は、国際公開番号W090/028 06、W094/19478、W096/34098等で示されているが、感染効率、長期安定性の点で満足できるものではなかった。また、ウイルスの力価を高めるために大量のウイルス構造タンパク質をパッケージング細胞中で発現させる必要がある。大量のウイルス構造タンパク質を発現し、継代によっても生産されるウイルスの力価の低下が起こりにくいパッケージング細胞が求められていた。

【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、高力価の感染性ウイルスを産生する能力を保持するウイルス産生細胞を提供することを課題とする。該細胞の好ましい態様において、長期安定性や安全性が高められたウイルス産生細胞を提供する。また、本発明は、該ウイルス産生細胞を用いる、高力価の感染性ウイルスの生産方法を提供することをも課題としている。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために、まず、293T細胞において、高い活性を有するプロモーターの探索を行った。本発明者は、SV40プロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター、TKプロモーター、MuLV LTR、CMV LTRの転写活性の強さを調べたところ、EF1 $\alpha$ プロモーターが、他のプロモーターに比較して顕著に高い活性を示すことを見出した。そこで、次に、EF1 $\alpha$ プロモーターを用いた高性能パッケージング細胞の樹立を試みた。

【 0 0 0 6 】

具体的には、本発明者は、パッケージング細胞において、ウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子の発現効率を高めるために、ウイルス構造タンパク質をコードするgag-polおよびenv遺伝子をEF1 $\alpha$ の制御下に組み込んだ。さらに、転写されたmRNAからのウイルス構造タンパク質の翻訳効率を高めるため、Kozak配列(GCCACC)を該遺伝子の翻訳開始コドンの上流に配した。さらに、該遺伝子の

下流にIRES配列 (internal ribosomal entry site: 内部リボソーム侵入部位) を介して選択マーカー耐性遺伝子をつなげることで、1本のmRNAからIRES前後にある遺伝子が翻訳され、構築物が導入され発現している細胞を選択マーカーにより確実に選択することを可能にした。すなわち、選択マーカー耐性遺伝子を有する構築物と、gag-polおよびenv遺伝子を有する構築物を別々に導入して作製されていた従来のパッケージング細胞よりも、長期安定性に優れた細胞を作製した。

## 【0007】

また、構築物上に、ウイルス構造タンパク質のコード領域のみをPCRによって増幅した遺伝子としてgag-polおよびenv遺伝子を挿入することにより、パッケージング細胞から組み換えによる野生型ウイルスが産生される可能性をなくし、安全性を向上させた。

## 【0008】

本発明者は、このようにして作製されたパッケージング細胞の性能につき検討を行なった結果、該パッケージング細胞は、高力価のレトロウイルスを産生し、4ヶ月の長期継代後でも、それ以前と同等の力価のレトロウイルスを産生する能力を保持していた。本発明のパッケージング細胞は生体内への遺伝子導入のためのベクターの作製に有用であり、特に遺伝子治療などに用いられる高力価レトロウイルスベクターの製造等に好適に利用しうる。

## 【0009】

即ち、本発明は、長期間継代しても高力価の感染性ウイルスを産生する能力を保持し、安全性にも優れたウイルス産生細胞、および該ウイルス産生細胞を用いる高力価の感染性ウイルスの産生方法に関し、より具体的には、

(1) レトロウイルスの産生に用いられる細胞であって、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を有する細胞、

(2) レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、gag、pol、envからなる群より選択される1または複数のタンパク質をコードするDNAである、(1)に記載の細胞、

- (3) g a g、p o l、e n vのすべてを発現する、(2)に記載の細胞、
- (4) g a gおよびp o lを発現する発現構築物とe n vを発現する発現構築物とを有する、(3)に記載の細胞、
- (5) e n vがエコトロピックレトロウイルス由来のe n vまたはアンフォトロピックレトロウイルス由来のe n vである、(3)または(4)に記載の細胞、
- (6) 発現構築物中のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAの翻訳開始コドンの上流に、K o z a kのコンセンサス配列が配置されている、(1)から(5)のいずれかに記載の細胞、
- (7) レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAがI R E S配列を介して選択マーカをコードするDNAと結合している、(1)から(6)のいずれかに記載の細胞、
- (8) レトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、該タンパク質のコード領域以外のウイルスゲノム由来DNAを実質的に有さない、(1)から(7)のいずれかに記載の細胞、
- (9) 細胞が2 9 3細胞由来である、(1)から(8)のいずれかに記載の細胞、
- (10) 細胞が2 9 3 T細胞由来である、(9)に記載の細胞、
- (11) 寄託番号F E R M B P - 6 7 3 7で特定される細胞、
- (12) (1)から(11)に記載の細胞に、少なくとも1つの構造タンパク質をコードする遺伝子を欠損しているレトロウイルスベクターDNAを導入する工程を含む、レトロウイルスの産生方法、
- (13) レトロウイルスベクターDNAが、g a g、p o l、およびe n vをコードする遺伝子をすべて欠損している、(12)に記載の方法、
- (14) レトロウイルスベクターDNAに外来遺伝子が含まれている、(12)または(13)に記載の方法、
- (15) (12)から(14)のいずれかに記載の方法により生産されたレトロウイルス、に関する。

【0 0 1 0】

## 【発明の実施の形態】

本発明のパッケージング細胞は、レトロウイルスの構造タンパク質を発現させるために、EF1 $\alpha$ プロモーターを用いることを特徴としている。本発明者等は、パッケージング細胞内で高い活性を示すプロモーターの探索を行なった結果、活性を検出したプロモーターの中で特にEF1 $\alpha$ プロモーターが強力な活性を有することを見出した。本発明のパッケージング細胞は、EF1 $\alpha$ プロモーターを用いることにより、レトロウイルスの構造タンパク質を高発現させ、力価の高いウイルス粒子の生産を行なうことを可能としている。

## 【0011】

パッケージング細胞において、EF1 $\alpha$ プロモーターの制御下でレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAを発現させるためには、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが機能的に結合した発現構築物を作製し、これを細胞に導入すればよい。ここで「機能的に結合」とは、EF1 $\alpha$ プロモーターがその活性化によって下流のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAの発現を保証するように該DNAに結合していることを指す。

## 【0012】

細胞において発現されるレトロウイルスの構造タンパク質としては、gag、pol、およびenvが挙げられる。論理的にはパッケージング細胞においてこれらすべてのタンパク質を発現させる必要はなく、レトロウイルスベクターDNAにこのうちのいくつかのタンパク質をコードする遺伝子をのせておくことも可能である。例えば、パッケージング細胞にgag、polを発現させて、env遺伝子はレトロウイルスベクターDNAにのせておくようなことも可能であるが、この場合にはenvの発現量が必要量まで達しない可能性がある。従って、パッケージング細胞においては、gag、pol、envの全てが発現していることが望ましい。

## 【0013】

発現構築物としては、gagおよびpolを発現する構築物とenvを発現する構築物を分けて細胞に導入することが好ましい。これにより、レトロウイルスベクターとパッケージング細胞内に存在するpol、gag、envとの間で組換えが生じて、自己複製可能なウイルスが産生される可能性を低下させることができる。このこと



は、例えば、該細胞により生産されるウイルスを遺伝子治療に用いる際の安全性の点から重要である。 gagおよびpolについては同じ構築物にgag-polとしてコードされていることが好ましい。仮に別々の発現構築物とした場合、polのみが多量に発現してしまうと細胞に対して毒性が生じることが知られており、また、polとgagの発現比率が高力価ウイルスの産生に重要であるからである。

## 【0014】

envとしては、所望によりエコトロピックレトロウイルス由来のenv (ecoenvと称する) やアンフォトロピックレトロウイルス由来のenv (amphoenvと称する) を用いてパッケージング細胞を作製することができる。ecoenvを有するパッケージング細胞からはエコトロピック (ecotropic) レトロウイルスが産生される。また、amphoenvを有するパッケージング細胞からは、アンフォトロピック (amphotropic) レトロウイルスが産生される。エコトロピックレトロウイルスは、ラットおよびマウスの細胞表面にのみに存在するエコトロピック受容体に結合する糖タンパク質を有することから、ラットあるいはマウス細胞にのみ感染する。一方、アンフォトロピックレトロウイルスは、より広範な種に対して感染可能であり、例えば、ラット、マウス、ヒト、ニワトリ、イヌ、ネコ等に感染できる。例えば、遺伝子治療に用いるレトロウイルスとしては、ヒトに感染可能なamphoenvが用いられる。また、実験室で新規遺伝子のクローニング等に用いる場合には、ヒトに感染できないecoenvを有するパッケージング細胞から作製されたレトロウイルスを用いることが安全である。

## 【0015】

また、ラウス肉腫ウイルス (RSV) 由来のenvなど種々のレトロウイルスenvが使用されうる (Landau N.R. and Littman D.R. (1992) J. Virology 51:110-1113)。さらに、レトロウイルス以外のエンベロープタンパク質を使用してもよい。例えば、水疱性口内炎ウイルス (VSV) 由来のG蛋白質 (VSV-G) を用いることができる (Ory D.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11400-11406)。

## 【0016】

本発明のパッケージング細胞においては、好ましい態様として、レトロウイル



スの構造タンパク質を発現させるための発現構築物から転写されたこれらタンパク質をコードするmRNAの翻訳効率を高めるため、該発現構築物中のレトロウイルスの構造タンパク質遺伝子の翻訳開始コドン(ATG)の上流にKozak配列のコンセンサス配列(GCCACC)を配することができる(Kozakの法則とは、翻訳開始点ATGの前の配列にGCCACCが存在する確率が高いことを明らかにしたものである)。

## 【0017】

本発明のパッケージング細胞の他の好ましい態様として、ウイルス構造タンパク質および選択マーカーをコードするDNAがIRESを介して機能的に結合し、ウイルス構造タンパク質と選択マーカーとが同時に発現する発現構築物を有するパッケージング細胞が提供される。該発現構築物においては、EF1 $\alpha$ 活性化により転写された単一分子内にウイルス構造タンパク質および選択マーカーがコードされており、該RNA分子からは、一方のタンパク質が翻訳されるのみならず、IRESの働きにより選択マーカーも翻訳される。このため該発現構築物が導入されレトロウイルス構造タンパク質を発現している細胞を、該選択マーカーにより確実に選択することが可能となった。従来は、選択マーカー耐性遺伝子を有する発現構築物と、gag-polおよびenv遺伝子を有する発現構築物を別々に細胞に導入してパッケージング細胞を作製していたため、選択マーカー耐性遺伝子を有する細胞とウイルス構造タンパク質遺伝子を有する細胞とが必ずしも一致せず、該細胞の安定性に問題が生じていたが、IRES配列の利用により長期安定性に優れたパッケージング細胞の調製が可能となった。

## 【0018】

選択マーカーとしては、実施例に記載したブラスチシジンやピューロマイシンの他に、例えばハイグロマイシン、ジフテリアトキシン、ネオマイシンなどを使うことができる。しかしながら、ブラスチシジンやピューロマイシンは、他の薬剤に比べて即効性で細胞の選択に必要な時間が短くてすむという点で好ましい。ジフテリアトキシンおよびハイグロマイシンの耐性遺伝子はそれぞれ「Bishai, W.R. et al., J. Bacteriol. 169: 1554-1563 (1987)」および「ハイグロマイシン: Yin, D.X. et al., Cancer Res. 55: 4922-4928 (1995)」に記載されている。

## 【0019】

本発明のパッケージング細胞のさらなる好ましい態様として、EF1 $\alpha$ 制御下のレトロウイルスの構造タンパク質をコードするDNAが、該タンパク質のコード領域以外のDNAを実質的に有さない発現構築物を有する細胞が提供される。本発明のパッケージング細胞においては、構造タンパク質の発現に必須ではないウイルスゲノム由来配列はできる限り除去されていることが好ましい。これにより、上記発現構築物を有するパッケージング細胞にレトロウイルスベクターDNAを導入した際に、該発現構築物中のウイルスゲノム由来DNAとレトロウイルスDNAの間の組換えの可能性を低下させ、複製能を有するレトロウイルス（RCR）が出現するリスクを最小限に抑制することができる。従って、これによりパッケージング細胞から産生されるウイルス粒子の安全性を向上させることができる。

## 【0020】

このようなレトロウイルスの構造タンパク質のコード領域以外のDNAを実質的に有さないDNAは、例えば、実施例に記載されたようにウイルスゲノムDNAを鋳型に、ウイルス構造タンパク質のコード領域に対応するプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により得ることができる。ここでコード領域以外のDNAを「実質的に有さない」とは、ウイルスゲノム由来のタンパク質コード領域以外のDNAが、30塩基以下、好ましくは10塩基以下、さらに好ましくは5塩基以下、最も好ましくは0塩基であることをいう。

## 【0021】

パッケージング細胞を作成するための宿主細胞としては、トランスフェクションによる遺伝子導入効率が高い細胞であれば制限はなく、例えば、NIH3T3（マウス繊維芽細胞）や293（ヒト胎児腎細胞）（Graham, F.L., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)）などを用いることができる。

## 【0022】

発現構築物の細胞への導入方法としては、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、あるいはリポフェクタミン（lipofectamine, GIBCO BRL）、フュージン（Fugene, Bohringer Mannheim）等による一般的な遺伝子導入方法を用いることができる。選択方法としては薬剤選択を用いることができ、薬剤選択に用

いる薬剤としては薬剤耐性遺伝子が明らかになっているものであれば制限はなく、例えば、プラスチシジン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ジフテリアトキシン、ネオマイシンなどを用いることができる。

#### 【0023】

得られたパッケージング細胞は、限界希釈し、各クローンにレトロウイルスベクターDNAを導入し、産生されるウイルスの力価を測定して、最も高い力価のウイルスを産生する細胞を選択しクローン化することが好ましい。

#### 【0024】

パッケージング細胞に導入されるレトロウイルスベクターDNAとしては特に制限はない。パッケージング細胞が293T細胞のようにSV40 ラージT抗原を発現する細胞に由来する場合は、SV40の複製開始点と結合された該ベクターDNAを用いれば、パッケージング細胞内でのコピー数を増加させることができ、力価の上昇を期待することができる。

#### 【0025】

レトロウイルスベクターDNAの細胞への導入は、上記ウイルス構造タンパク質発現構築物の細胞への導入と同様に行うことができる。レトロウイルスベクターを導入後、パッケージング細胞の培養上清中に放出されるレトロウイルス粒子を回収することにより、目的のレトロウイルスベクターを調製することができる。

#### 【0026】

本発明のパッケージング細胞により生産されたレトロウイルスベクターは、広範囲の研究・医療分野に有用に用いられる。例えば、遺伝子治療やモデル動物の作製において目的の遺伝子をex vivo または in vivo で発現させるためのベクターとして用いられる。また、抗原タンパク質や免疫機能を高めるタンパク質を発現させるためのワクチンとしても有用である。また、遺伝子機能を解析するための in vitro 遺伝子導入ベクターとしても有用である。また、該ベクターを、目的のタンパク質を製造するために用いることもできる。また、cDNA発現ライブラリーのように、不特定のcDNA分子種を発現するライブラリーの作製用ベクターとしても有用である。

【0027】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0028】

## 【実施例1】 FACS-GAL解析

293細胞、293T細胞においてプロモーター活性を比較し、最も高い活性を示すプロモーターを用いるため、FACS-GAL解析(Steven N.F., et al., Cytometry, 12, 291-301, 1991)を行った。これはそれぞれのプロモーターの下流にlacZ遺伝子をつなぎ、細胞内にトランスフェクションしてその細胞内でのlacZの発現分布を調べるものである。

【0029】

トランスフェクションする16~24時間前に293細胞、293T細胞を6cm 組織/培養皿に $2 \times 10^6$ まいた。それぞれのプロモーターの下流にlacZをつないだプラスミド 3 $\mu$ g、Fugene(Boehringer Mannheim社) 9 $\mu$ lを200 $\mu$ lの胎児ウシ血清を含まないDMEM培地に混合し、5~10分おいた。その後、293細胞、293T細胞を播いた6cm皿にゆっくり加えた。24時間後細胞をはがし、50 $\mu$ lのPBSに懸濁した後、37℃で5分間置いた。FDG(フルオレセイン ジ-b-D-ガラクトピラノシド, モレキュラープローブ, Eugene, OR, カタログ番号F1179: 2mM in 98% 蒸留水)をあらかじめ37℃で温めておき、50 $\mu$ lを加えた。37℃で1分間インキュベートしたあと、PBSを1ml加え、氷上で2時間おく。2時間後反応を止めるためPETG(フェニルエチル-b-D-チオガラクトシド, Sigma, カタログ番号P4902)を20 $\mu$ l加え、FACSにて細胞内のlacZの発現分布を調べた。その結果、293T細胞内において、EF1 $\alpha$ のプロモーター活性が一番高かった。レトロウイルスのプロモーターであるLTRと比較した場合、EF1 $\alpha$ のプロモーター活性は約100倍高く、その他のプロモーターに対しても数十倍高い活性を示した。

【0030】

## 【実施例2】 選択マーカー遺伝子の増幅

選択マーカーとしてブラスチジシン (blasticidin)、ピューロマイシン (pur

omycin) を用いるため、それぞれの抵抗性遺伝子 ( $bs^r$ : Kamakura. T. et al., Agric. Biol. Chem., 51, 3165-3168, 1987.  $puro^r$ : Buchholz. F. et al., Nucleic Acids Res., 24, 3118-3119, 1996) を鋳型として、以下のPCRの条件で、反応を行った。

反応組成は鋳型DNA 10ng、10×KOD バッファー $5\mu\text{l}$ 、2mM dNTP  $5\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{M}$  プライマーそれぞれ $2.5\mu\text{l}$  (プライマーの塩基配列は以下に示す)、25mM  $\text{MgCl}_2$   $2\mu\text{l}$ 、2.5U/ml KOD DNA ポリメラーゼ (TOYOBO社)  $1\mu\text{l}$ である。

#### 【0031】

プライマーは、プラスチシジン抵抗性遺伝子 ( $bs^r$ ) については 5'-AAAACATTT AACATTTCTCAACAAG-3' (配列番号: 1) および 5'-ACGCGTCGACTTAATTTCTGGGTATATT TGAGTG -3' (配列番号: 2) を、また、ピューロマイシン抵抗性遺伝子 ( $puro^r$ ) については 5'-ACCGAGTACAAGCCACG-3' (配列番号: 3) および 5'-ACGCAGATC TTCAGGCACCGGGCTTG-3' (配列番号: 4) を用いた。温度条件は94℃ 30秒、94℃ 30秒・54℃ 30秒・72℃ 2分を25サイクル、72℃ 10分である。プラスチシジン抵抗性遺伝子( $bs^r$ )はSalIで、ピューロマイシン抵抗性遺伝子( $puro^r$ )はBglIIで制限酵素処理した後、電気泳動し、ゲルからの抽出を行った。抽出にはQiaexII(QIAGEN社)を用いた。

#### 【0032】

#### 【実施例3】 pMX-IRES-EGFP の調製

IRES (internal ribosomal entry site: 内部リボソーム侵入部位) 配列とは、ウイルスのmRNAの5' 非翻訳領域に存在する配列であり、特徴的な二次構造をとると考えられている。本配列をリボソームが認識して翻訳が開始し、宿主の蛋白翻訳が抑えられ、ウイルス蛋白の翻訳を優位にすることができることになる。そのIRESの後ろに選択マーカー抵抗性遺伝子をつなげるため、pMX-IRES-EGFP (Staal. F.J.T., et al., Cancer Gene Therapy, 3, 345-351, 1996) をNcoIで制限酵素処理した。その後エタノール沈殿を行い、クレノウ反応により平滑末端化した。フェノール/クロロホルム処理のあと、エタノール沈殿を行い、 $bs^r$ を入れる場合にはSalI、 $puro^r$ を入れる場合にはBglIIで制限酵素処理し、それぞれライゲーションした。このようにしてIRESの後ろに選択マーカー抵抗性遺伝子が位置する

ことになる。pMX-IRES-bs<sup>r</sup>は NotI (TAKARA社) と SalI で、pMX-IRES-puro<sup>r</sup>は NotI と BglIII で制限酵素処理し、IRES-bs<sup>r</sup>、IRES-puro<sup>r</sup>の断片を切り出した。

## 【0033】

[実施例4] gag-pol、エコトロピックenvの増幅

gag-pol、エコトロピックenvのPCRを以下の条件で行った。

反応組成は鋳型DNA (Shinnick, et al. Nature, 293, 543, 1981) 10ng、10×LA Taq バッファー5μl、2mM dNTP 8μl、10μM プライマーそれぞれ1μl(塩基配列は以下に示す)、5U/ml LA Taq (TAKARA社) 0.5μlである。

プライマーは、gag-polの増幅は 5'-CGAATTCGCCGCCACCATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAA-3' (配列番号: 5) および 5'-TACGCCGGCGCTCTGAGCATCAGAAGAA-3' (配列番号: 6)、また、エコトロピックenv 増幅は 5'-CGAATTCGCCGCCACCATGGCGCGTTCAACGCTCTCAAAA-3' (配列番号: 7) および 5'-TACGCCGGCGCTATGGCTCGTACTCTAT-3' (配列番号: 8) を用いた。

温度条件はgag-pol の場合、98℃ 2分、98℃ 20秒・68℃ 3分を20サイクル、68℃ 8分である。エコトロピックenvの場合、98℃ 2分、98℃ 20秒・68℃ 2分を30サイクル、68℃ 7分である。

PCR産物を電気泳動で流したのち、QiaexII (QIAGEN社) によりゲルからDNA抽出を行った。これをOriginal TA cloning kit (Invitrogen社) によりTAベクターにサブクローニングし、EcoRI、NotI (TAKARA社) 処理した。

## 【0034】

[実施例5] gag-pol、エコトロピックenv発現ベクターの構築

EF1α のコントロール下でgag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>、env-IRES-puro<sup>r</sup>を発現させるために、以下のようにpCHO (Hirata, Y. et al., FEBS Letter, 356, 244-248 (1994); Okayama Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 838-45 (1996); pCHOはpEF-BOS(Mizushima, S., and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5332, 1990)に由来する)に挿入した。

[pCHO(gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>)]

pCHOをBamHI (TAKARA) により制限酵素処理した後、クレノウ反応により平滑末端化した。そこへSalI リンカーd(CGGTCGACCG) (Stratagene社) (配列番号:

9) をつけた後、EcoRI、SalI (TAKARA) で制限酵素処理した。ここへ実施例 2, 3 で作製した gag-pol、IRES-bs<sup>r</sup> 断片をいれ、pCHO (gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>) を作製した。

[pCHO (ecoenv-IRES-puro)]

pCHO を EcoRI、BamHI (TAKARA 社) で制限酵素処理し、ここへ実施例 2, 3 で作製した エコトロピック env、IRES-puro<sup>r</sup> を挿入し、pCHO (ecoenv-IRES-puro) を作製した。

【0035】

[実施例 6] アンフォトロピック env 発現ベクターの構築

エコトロピック env は同種由来の細胞にのみ感染可能であるのに対し、アンフォトロピック env は幅広い細胞に感染可能である。このアンフォトロピック env を用いて、実施例 4 および 5 と同様に env-IRES-puro<sup>r</sup> の発現ベクターの構築を行った。反応組成は アンフォトロピック env 遺伝子 (4070A) (Ott, D. et. al., J. Virol. 64, 757-766., 1990) の挿入されているプラスミド 10ng、10×KOD バッファー 5 μl、2mM dNTP 5 μl、10 μM プライマー (塩基配列は以下に示す) それぞれ 2.5 μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 2 μl、2.5U/ml KOD DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) 1 μl である。プライマーは、5'-CGAATTCGCCGCCACCATGGCGCGTTCAACGCTCTCAAAA-3' (配列番号: 10) および 5'-ATGCGGCCGCTCATGGCTCGTACTCTAT-3' (配列番号: 11) を用いた。温度条件は 98°C 3分、98°C 15秒・65°C 2秒・72°C 30秒を 25 サイクル、72°C 10分である。

実施例 5 で作製した pCHO (ecoenv-IRES-puro) を EcoRI、NotI で制限酵素処理し、クレノウ処理によって、平滑末端化した。ここへ上記アンフォトロピック env をライゲーションし、pCHO (amphoenv-IRES-puro) を作製した。

【0036】

[実施例 7] パッケージング細胞の樹立

ヒト中腎由来細胞 293T 細胞 (DuBridge, R.B., et. al., Mol. Cell. Biol. 7, 379-387. 1987) に、作製したコンストラクトをトランスフェクションした。トランスフェクションする 16~24 時間前に 293T 細胞を 6cm 組織/培養皿に 2×10<sup>6</sup> maid。pCHO (gag-pol-IRES-bs<sup>r</sup>) 3 μg、Fugene (Boehringer Mannheim 社) 9 μl を



200  $\mu$ l のウシ胎児血清を含まないDMEM培地に混合し、5～10分静置した。その後、293T 細胞をまいた6cm dishにゆっくり加えた。48時間後細胞をはがし、10cm 皿にまき、10% ウシ胎児血清を含むDMEM 培地（ブラスチジン 8  $\mu$ g/ml）を加えた。

約10日後、pCHO(ecoenv-IRES-puro)、またはpCHO(amphoenv-IRES-puro)それぞれを同様にトランスフェクションし、ピューロマイシン (0.8  $\mu$ g/ml およびブラスチジン (8  $\mu$ g/ml)の両方が入った培地で培養した。細胞が増殖してきたところで限界希釈し、単一のクローンにすることで目的とするパッケージング細胞を樹立した。当該パッケージング細胞を「Platinum-E細胞 (PLAT-E細胞)」と名付けた。

ecoenv発現ベクターを導入したPLAT-E細胞は、下記の寄託機関に寄託した。

【0037】

ecoenv導入PLAT-E細胞 (Pt-E)

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-0

046）

(ロ) 寄託日（原寄託日） 平成11年5月31日

(ハ) 寄託番号 生命研条寄第6737号（FERM BP-6737）

【0038】

〔実施例8〕 レトロウイルスの産生

パッケージング細胞により得られたウイルス液の感染効率を調べるため、以下の方法で感染実験を行った。トランスフェクションする16～24時間前に、パッケージング細胞（ecoenv導入PLAT-E細胞）を6cm 組織/培養皿に $2 \times 10^6$ まいた。Mo LuLVを基本骨格としたレトロウイルスベクターで、GFPが組み込まれているベクター DNA(pMX-GFP: Onishi. M., et al., Exp. Hematol., 24, 324-329, 1996) 3  $\mu$ g、Fugene 9  $\mu$ lを200  $\mu$ lの血清を含まないDMEM 培地に混合し、5～10分おいた。その後、これをパッケージング細胞をまいた6cm 皿にゆっくり加えた。

【0039】

48時間後に上清（ウイルス液）を回収し、3000rpmで5分間遠心した。このうち、500  $\mu$  l に 1mg/ml ポリブレン (sigma社) を 5  $\mu$  l、 $\times 1000$  IL3 (R and D) を 1  $\mu$  l 加え、 $1 \times 10^5$  の BaF/3 細胞に 5 時間感染させた。5 時間後、RPMI1640 培地 (IL3 含有) を 500  $\mu$  l 加えた。感染した細胞内において GFP が発現され、395nm 波長の光で励起し、509nm の波長の光を放出することを利用し、FACScan (fluorescein activated cell sorter : Becton-Dickinson) を用いて発光する（感染発現している）細胞の割合を感染効率として、24 時間後に測定した。BaF/3 細胞に対する感染効率はウイルス液を濃縮することなく用いても 95% に達した。

【0040】

液体窒素から同時期に起こした PLAT-E (ecoenv 導入 PLAT-E 細胞) と BOSC23 の感染効率を BaF/3 細胞を用いて測定したところ、継代を開始して 7 日目では、いずれのパッケージング細胞でも 90% 以上の感染効率が確認されたが、継代 2 ヶ月後には、BOSC23 の感染効率が 23% にまで低下したのに対し、PLAT-E では、7 日目の感染効率と同程度の感染効率が、継代 2 ヶ月後および 4 ヶ月後においても保持されていることが確認された。

【0041】

【発明の効果】

本発明により、長期間継代しても高力価の感染性ウイルスを産生する能力を保持するウイルス産生細胞が提供された。また、該ウイルス産生細胞を用いる、高力価の感染性ウイルスの産生方法が提供された。本発明のレトロウイルスパッケージング細胞を用いれば、高力価のレトロウイルスを安定に供給することが可能となる。また、パッケージング細胞に含まれるウイルスゲノムを最小限にすることにより、複製能を有するレトロウイルス (RCR) 等の望ましくない組換え体ウイルスの生成を抑えることが可能となった。従って、本発明のレトロウイルスパッケージング細胞は、生物学、医学研究分野において、レトロウイルスベクター作製のための強力なツールとなる他、遺伝子治療における遺伝子導入ベクターの作製にも有用である。

【0042】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KITAMURA, Toshio

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Packaging cell

<130> C1-105

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

aaaacattta acatttctca acaag

25

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

acgcgtcgac ttaatttcgg gtatatttga gtg

33

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

accgagtaca agcccacg

18

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

acgcagatct tcaggcaccg ggcttg

26

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

cgaattcgcc gccaccatgg gccagactgt taccactccc ttaa

44

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tacgccggcg ctctgagcat cagaagaa

28

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

cgaattcgcc gccaccatgg cgcgttcaac gctctcaaaa

40

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tacgccggcg ctatggctcg tactctat

28

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized "Sall linker" Sequence

<400> 9

cggtcgaccg

10

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

cgaattcgcc gccacatgg cgcgttcaac gctctcaaaa

40

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

atgcggccgc tcatggctcg tactctat

28



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 長期間継代しても高力価の感染性ウイルスを産生する能力を保持するウイルス産生細胞、該ウイルス生産細胞を用いる高力価の感染性ウイルスの生産方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 EF1 $\alpha$ プロモーターの制御下でウイルス構造遺伝子を発現させることにより、高力価のウイルスを産生する能力を保持するウイルス産生細胞の作製に成功した。

該ウイルス産生細胞において、ウイルス構造遺伝子と選択マーカー遺伝子をIRESを介して結合させ、またウイルス構造タンパク質をコードするDNAからタンパク質コード領域以外の領域を除去することにより、細胞の継代による力価の低下を防止すると共に、ウイルスゲノムの望ましくない組換えによる野生型ウイルスの出現を防止した。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 C1-105  
【提出日】 平成11年 6月 3日  
【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第154364号

【補正をする者】

【識別番号】 599002744

【氏名又は名称】 北村 俊雄

【補正をする者】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 提出物件の目録

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証の写し 1

国際様式 INTERNATIONAL FORM



29910400026


[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い  
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称) 株式会社中外分子医学研究所  
代表者 大杉 義征

寄託者

あ て 名 氏

殿

茨城県新治郡新治村水井 153-2

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) P1-E	(受託番号) FERM BP- 6737
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 5 月 31 日 (原寄託日) に受領した 1 種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 種の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Agency for Industrial Science and Technology 名称: 大杉 義征 所長 大杉 義征 Dr. Shigeaki Osada Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市 1-3-1 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 11 年 (1999) 5 月 31 日	

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第154364号
受付番号	29910400026
書類名	手続補正書
担当官	長谷川 実 1921
作成日	平成11年 8月17日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	599002744
【住所又は居所】	東京都港区白金6-16-20-406
【氏名又は名称】	北村 俊雄

【補正をする者】

【識別番号】	000003311
【住所又は居所】	東京都北区浮間5丁目5番1号
【氏名又は名称】	中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】	申請人
【住所又は居所】	100102978 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	受託証の写し 1
---------	----------

次頁無

【書類名】 手続補正書  
 【整理番号】 C1-105  
 【提出日】 平成11年 6月24日  
 【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第154364号

【補正をする者】

【識別番号】 599002744  
 【氏名又は名称】 北村 俊雄

【補正をする者】

【識別番号】 000003311  
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願  
 【補正対象項目名】 発明者  
 【補正方法】 追加

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金 6 - 1 6 - 2 0 - 4 0 6

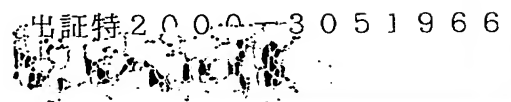
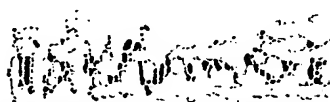
【氏名】 北村 俊雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区南麻布 5 - 1 1 - 9 - 2 0 2

【氏名】 森田 純代

【その他】 本補正書で補正する理由は、発明者を、「北村俊雄」「森田純代」の2名を記載すべきところを出願時に誤って



「北村俊雄」のみにしてしまった為であります。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第154364号
受付番号	59900605843
書類名	手続補正書
担当官	長谷川 実 1921
作成日	平成11年 8月17日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	599002744
【住所又は居所】	東京都港区白金6-16-20-406
【氏名又は名称】	北村 俊雄

【補正をする者】

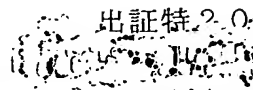
【識別番号】	000003311
【住所又は居所】	東京都北区浮間5丁目5番1号
【氏名又は名称】	中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

次頁無

出証特2000-3051966



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599002744]

1. 変更年月日 1998年11月25日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区白金6-16-20-406

氏 名 北村 俊雄



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日

1990年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名

中外製薬株式会社

100-443889-100-443890